

## 间充质干细胞治疗慢性肢体威胁性缺血的临床研究进展

刘志强<sup>1\*</sup>, 谷旭放<sup>1</sup>, 倪爱新<sup>1</sup>, 范姗姗<sup>2</sup>

天津中医药大学第二附属医院 1. 科学技术科; 2. 临床药理中心, 天津 300250

**摘要:**慢性肢体威胁性缺血 (CLTI) 是一种严重的外周动脉疾病 (PAD), 其主要特征是肢体血流减少, 导致组织损伤和功能障碍。间充质干细胞 (MSCs) 因其独特的再生能力和免疫调节特性, 近年来已成为 CLTI 治疗领域的研究热点。在缺氧和组织损伤环境下, MSCs 可通过分泌细胞因子、细胞分化以及细胞间信号传递等多种机制, 促进血管新生、减轻炎症反应并促进组织修复, 从而改善 CLTI 患者的症状和预后, 展现出广阔的临床应用前景。

**关键词:** 间充质干细胞; 慢性肢体威胁性缺血; 细胞治疗; 血管新生; 临床研究

中图分类号: R543.5 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2025.11.1511

## Clinical research progress on mesenchymal stem cells in the treatment of chronic limb-threatening ischemia

LIU Zhiqiang<sup>1\*</sup>, GU Xufang<sup>1</sup>, NI Aixin<sup>1</sup>, FAN Shanshan<sup>2</sup>

1. Department of Science and Technology; 2. Clinical Pharmacology Center, the Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China

**Abstract:** Chronic limb-threatening ischemia (CLTI) is a serious peripheral arterial disease (PAD) characterized by reduced blood flow in the limbs, resulting in tissue damage and dysfunction. Mesenchymal stem cells (MSCs) have become a research hotspot in the field of CLTI treatment in recent years due to their unique regenerative ability and immunomodulatory properties. In the environment of hypoxia and tissue injury, MSCs can promote angiogenesis, reduce inflammation and promote tissue repair by secreting cytokines, cell differentiation and inter-cellular signal transduction, so as to improve the symptoms and prognosis of patients with CLTI, showing a broad clinical application prospect.

**Key words:** mesenchymal stem cells; chronic limb-threatening ischemia; cell therapy; angiogenesis; clinical research

慢性肢体威胁性缺血 (chronic limb-threatening ischemia, CLTI) 是外周动脉疾病 (peripheral artery disease, PAD) 最严重的阶段, 主要表现为肢体静息痛、溃疡及坏死, 严重时可导致截肢和患者死亡<sup>[1]</sup>。CLTI 的病理生理机制复杂, 涉及动脉粥样硬化、血

流动力学改变、组织缺氧、炎症反应以及感染等多个方面。传统的治疗方法如药物治疗、血管成形术和旁路手术等, 虽然在一定程度上能够缓解症状, 但对于晚期患者效果有限。因此, 探索新型治疗方法显得尤为重要。近年来, 间充质干细胞 (mesenchymal

收稿日期: 2024-10-13 修回日期: 2025-03-25

基金项目: 天津市教委科研计划 (2021KJ154)

\* 通信作者 (corresponding author): zhiqiangtc@163.com

stem cells, MSCs) 因其具有来源广泛、获取相对简单、免疫原性低以及强大的再生潜力等特点,逐渐成为 CLTI 治疗的研究热点<sup>[2]</sup>。MSCs 在促进血管新生和改善缺血组织血流供应方面具有重要作用,这为 CLTI 的治疗提供了新的思路 and 希望。

## 1 MSCs 的来源和基本特征

MSCs 是一类起源于中胚层,具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞,广泛存在于全身多种组织中,在组织工程和再生医学领域具有重要的应用价值。根据其来源, MSCs 可分为成人来源的 MSCs (如骨髓和脂肪组织) 和胚胎来源的 MSCs (如脐带和胎盘)。MSCs 呈成纤维细胞样,具有塑性贴壁性,能够在体外增殖并分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等多种细胞类型。MSCs 表达特异性表面抗原,例如 CD29、CD73、CD90、CD44 和 CD105,缺乏内皮标志物 (CD31)、造血标志物 (CD14、CD34、CD45) 以及共刺激分子 (CD80、CD86) 的表达<sup>[3]</sup>。由于所处微环境的不同,不同来源的 MSCs 在增殖能力、分化潜能及免疫调节功能等方面存在差异,这使得它们在再生医学中具有不同的应用潜力<sup>[4]</sup>。

## 2 MSCs 治疗 CLTI 的潜在机制

MSCs 促进血管新生。在缺血微环境中, MSCs 通过分泌多种细胞因子,如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factors, FGFs) 和血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等,刺激血管内皮细胞的增殖和迁移,从而促进血管新生<sup>[5]</sup>。同时, MSCs 能够与内皮细胞相互作用,促进内皮细胞的聚集和管腔形成,并通过分化为内皮样细胞直接参与血管的构建<sup>[6]</sup>。MSCs 还通过释放细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 参与血管新生过程。这些囊泡携带 RNA、蛋白质和脂质等多种生物活性分子,能够调节周围细胞的功能,进一步增强血管生成的能力<sup>[7]</sup>。

MSCs 抑制炎症反应。CLTI 患者常伴有慢性炎症反应,这种炎症反应会加剧血管功能障碍和组织损伤。MSCs 通过分泌多种抗炎细胞因子,如转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 和  $\alpha/\beta$  干扰素

(interferon- $\alpha/\beta$ , IFN- $\alpha/\beta$ ) 等,有效抑制炎症反应并促进组织修复<sup>[8]</sup>。同时, MSCs 能够降低促炎细胞因子的水平,抑制炎症性细胞的募集,从而减轻炎症反应的强度,为缺血组织的修复创造有利环境<sup>[9]</sup>。此外, MSCs 通过分泌外泌体 (exosomes) 传递抗炎信号。这些外泌体中含有多种生物活性分子,能被周围细胞摄取并调节其功能,减轻炎症反应和组织损伤<sup>[10]</sup>。

MSCs 重建免疫稳态。在巨噬细胞调控方面, MSCs 通过与免疫细胞的直接相互作用或分泌多种细胞因子,调节巨噬细胞的极化状态,使其从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转变,从而减轻组织的炎症损伤<sup>[11]</sup>。在 T 细胞调控中, MSCs 通过细胞接触以及色氨酸耗竭等机制,选择性抑制辅助性 T 细胞 1/17 (T helper cell 1/17, Th1/17) 的功能,促进调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 分化,实现对免疫反应的精准调控<sup>[12]</sup>。

## 3 MSCs 治疗 CLTI 的临床研究

MSCs 是具有归巢能力的特殊细胞群,可以选择性的迁移到缺血部位。近年来,关于 MSCs 治疗 CLTI 的临床研究不断增多,相关的临床试验也在不断推进。查询 ClinicalTrials.gov, 有 28 项关于 MSCs 治疗 CLTI 的临床试验信息,涉及的 MSCs 的主要来源于骨髓、脂肪和围产组织。

### 3.1 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 是最早被应用于细胞治疗的干细胞类型之一。BM-MSCs 能够显著改善 CLTI 患者的临床症状和生活质量。相较于骨髓单个核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs), BM-MSCs 表达更高水平的 VEGF、FGFs 和血管生成素 (angiopoietin, ANG), 在增加下肢血液灌注和促进足部溃疡愈合方面更有效; 其他疗效评价指标, 例如无痛行走时间、踝臂指数 (ankle brachial index, ABI)、经皮氧分压 (transcutaneous oxygen pressure, TcPO<sub>2</sub>) 等, 也显示后者优于前者<sup>[13]</sup>。为达到治疗所需的细胞数量, 利用自动、封闭的离体培养系统体外扩增 BM-MSCs, 仅需收集少量骨髓细胞, 这样既可以减轻对患者的损害, 也可以有效减轻患者痛苦。利用体外扩增的自体 BM-MSCs 治疗 CLTI 是

安全有效的,未发现因骨髓采集、细胞治疗或注射过程而导致的不良事件<sup>[14]</sup>。

与自体 BM-MSCs 相比,同种异体 BM-MSCs 具有许多优势。首先,由于采集同种异体 BM-MSCs 不需要对患者实施手术,因此,避免了手术风险,减轻了患者的生理和心理压力。其次,健康供体来源的 BM-MSCs 在生物学特性上表现出更好的稳定性和一致性。此外,异体 BM-MSCs 的促血管生成能力可在移植前通过体外测试进行评估。一项 I/II 期临床研究旨在评估肌肉注射同种异体 BM-MSCs 对肢体缺血患者的影响。结果显示,与基线值相比,BM-MSCs 注射 24 周后,患肢的 ABI 平均增加 0.22,踝动脉压平均增加 19 mmHg,而安慰剂组 ABI 无显著变化,踝动脉压平均变化仅为 3.92 mmHg,由此表明 BM-MSCs 组在改善血流灌注方面显著优于安慰剂组<sup>[15]</sup>。Stempeucel 是一种局部注射的同种异基因混合 BM-MSCs,作为全球第一个被批准用来治疗肢体缺血性疾病的干细胞产品,已获印度药品管理总局批准。研究表明,Stempeucel 治疗具有安全性高、疗效持久的特点,不仅能有效缓解疼痛,还能促进溃疡愈合<sup>[16]</sup>。基于这些积极的结果,另一项 IV 期临床试验 (clinicalTrials.gov ID: NCT05854641) 正在进行,目前尚未公布相关数据。

### 3.2 脂肪间充质干细胞

脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, AD-MSCs) 在人体内含量丰富,可以通过吸脂或切除等微创手术从皮下或内脏脂肪组织中获取。AD-MSCs 在功能和形态特征上与 BM-MSCs 有诸多相似之处。研究发现,AD-MSCs 不仅具有分化为内皮细胞的潜能,还能释放多种促血管生成的生长因子,如 VEGF、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 和基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 等,在干细胞介导的血管生成中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。与 BM-MSCs 相比,AD-MSCs 的获取过程更为简便,对机体损伤小;同时,AD-MSCs 展现出更强的促血管生成能力,且在体外培养时增殖速度更快,能够在短时间内获得大量细胞以满足临床需求。

ACellDREAM 是首个利用体外培养的自体 AD-MSCs 治疗肢体缺血患者的临床试验,研究发现,细胞移植后未发生与 AD-MSCs 治疗相关的不良事

件;患者的 TcPO<sub>2</sub> 和伤口愈合状况均有所改善<sup>[18]</sup>。然而,CLTI 患者常伴有糖尿病,高血糖环境以及与糖尿病相关的其他代谢因素可能影响 AD-MSCs 的增殖、分化和血管生成能力,而来自健康供体的 AD-MSCs 具有相对均一性和稳定性。NOMA 是一项多中心、随机、双盲和安慰剂对照的 II 期临床试验 (clinicalTrials.gov ID: NCT04466007),设计纳入 90 例 2 型糖尿病合并严重下肢缺血且无法进行血管重建的患者,旨在评估肌肉注射同种异体 AD-MSCs 的安全性、耐受性和有效性,目前相关数据尚未公布<sup>[19]</sup>。

### 3.3 围产期间充质干细胞

围产组织主要包括胎盘、脐带及其所含的血液等。近年来,围产期间充质干细胞 (perinatal mesenchymal stem cells, PMSCs) 受到学者们的广泛重视,被认为是再生医学和组织工程中最有前途的细胞来源之一。PMSCs 在多项临床研究试验中展现出其治疗肢体缺血的强大潜力<sup>[20-22]</sup>。与成人来源的 MSCs 相比,PMSCs 的分化潜能和免疫调节能力更强,免疫原性更低,而且其采集过程不会造成身体上的痛苦与不适。

PLX-PAD 是一种胎盘源性间充质样细胞 [placental-expanded/derived (PLX) mesenchymal stromal cells], 表现出良好的促血管新生作用。其通过分泌 VEGF、HGF、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 以及 ANG 等细胞因子,促进内皮细胞的增殖、迁移和管状结构形成<sup>[23]</sup>。在非糖尿病患者或控制良好的糖尿病患者中,PLX-PAD 治疗显著改善了患者的 12 个月无截肢生存率,展现出良好的临床应用前景<sup>[24]</sup>。另一项随机对照试验比较了自体 BM-MNCs 与同种异体脐带胶质来源的间充质干细胞 (allogeneic Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells, allo-WJ-MSCs) 的疗效。结果显示,接受自体 BM-MNCs 和 allo-WJ-MSCs 治疗的患者在 Rutherford 分级、TcPO<sub>2</sub> 值、疼痛评分和无痛步行距离等方面均有显著改善,且在 12 个月的随访期间保肢率达 100%,而安慰剂组 60% 的患者在不同时间内被迫截肢。值得注意的是,allo-WJ-MSCs 的治疗效果总体优于自体 BM-MNCs,结果令人鼓舞<sup>[25]</sup>。

## 4 MSCs 治疗 CLTI 的输注方式和安全性

局部注射是 MSCs 治疗 CLTI 最常见的输注方



式,通常采用缺血区域肌肉注射。局部注射能够将 MSCs 直接输送到病变部位,并在局部形成 MSCs 库,释放血管生成相关因子,从而快速发挥治疗作用。然而,这种方式可能会造成组织损伤,如局部肌肉硬化或继发感染等。全身输注(如静脉内或动脉内输注)使用较少,这种方式可使细胞广泛分布于全身。MSCs 必须从血液循环迁移到靶组织才能发挥作用,这是一个复杂的过程,需要多种细胞因子的参与。尽管 MSCs 在治疗 CLTI 方面展现出良好的临床转化潜力,但仍缺乏标准化的输注方式以保证 MSCs 的最佳植入。目前,不同输注方式的疗效差异尚无定论,也无推荐的 MSCs 输注方式。因此, MSCs 输注方式的确定仍需要进行更多的对照研究。

MSCs 治疗 CLTI 的安全性是临床应用的重要考量因素。安全性评估和不良反应监测是评估任何治疗方法的关键环节。在 MSCs 治疗 CLTI 的临床试验中,安全性评估主要关注细胞移植后的免疫反应、感染以及潜在的肿瘤形成风险。总体而言, MSCs 治疗表现出良好的安全性,患者在接受治疗后未出现严重的免疫反应或感染事件。然而,少数病例报告了轻微的不良反应,如注射部位的短暂红肿或轻微发热,这些反应通常在短时间内自行消退,不影响整体治疗效果。尽管如此,仍需对 MSCs 的长期安全性进行持续监测,特别是在不同患者群体中的应用

效果和潜在风险。因此,建立完善的随访机制和不良事件报告系统,将有助于进一步评估 MSCs 在 CLTI 治疗中的安全性和有效性,为其临床推广提供科学依据。

## 5 问题与展望

尽管多项临床研究表明 MSCs 治疗 CLTI 的有效性,但目前该疗法仍未达到常规临床应用的标准。首先, MSCs 的来源、纯度和移植途径尚未实现标准化,这可能导致治疗效果的不一致性。其次, MSCs 的长期疗效和安全性仍需进一步验证,特别是在大规模临床试验中。此外, MSCs 的免疫调节机制和促血管生成机制尚未完全阐明,这限制了对治疗效果的进一步优化。为推动 MSCs 在 CLTI 治疗中的应用,未来仍然有很多工作要做。一是要更深入地了解 MSCs 的特征和功能,实现 MSCs 制备和移植流程的标准化,确保治疗的一致性和安全性;二是要深入探索 MSCs 的作用机制,特别是其在免疫调节和促血管新生中的机制,这可能促进无细胞成分疗法的开展。三是要开展多中心、大规模的随机对照试验,系统评价 MSCs 的长期疗效和安全性。相信随着标准化培养方法的建立和完善,以及临床安全性和有效性的反复验证, MSCs 疗法有望在不久的将来成为 CLTI 患者的常规治疗选择,帮助患者避免截肢和死亡的风险,改善其生活质量。

## 参考文献:

- [1] 王海妍,方晓梅,刘焕萍,等. 慢性肢体威胁性缺血患者生活质量现状与影响因素分析[J]. 中国血管外科杂志(电子版),2024,16: 152-156.
- [2] Sojakova D, Husakova J, Fejfarova V, *et al.* The use of autologous cell therapy in diabetic patients with chronic limb-threatening ischemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25: 10184. 10.3390/ijms251810184.
- [3] Sajjad U, Ahmed M, Iqbal MZ, *et al.* Exploring mesenchymal stem cells homing mechanisms and improvement strategies[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2024, 13: 1161-1177.
- [4] 王巧玲,张晓彤,徐衍,等. 3 种不同来源 CD146 阳性间充质干细胞亚群的生物学特性比较[J]. 基础医学与临床, 2020, 40: 41-47.
- [5] 肖凤君,黄晓东,王少霞,等. Ad-HGF 基因修饰的胎盘间充质干细胞治疗兔肢体缺血的实验研究[J]. 军事医学, 2016, 40: 285-288.
- [6] 张婉,高斌,符伟国,等. FOS 样抗原 1 修饰间充质干细胞移植促进缺血肢体血管新生的实验研究[J]. 老年医学与保健, 2022, 28: 1353-1358.
- [7] Peng X, Liu J, Ren L, *et al.* Extracellular vesicles derived from hypoxia-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate lower limb ischemia by delivering miR-34c[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478: 1645-1658.
- [8] Huang W, Kraynak CA, Bender EC, *et al.* Soluble components from mesenchymal stromal cell processing exert anti-inflammatory effects and facilitate ischemic muscle regen-

- eration[J]. *Cytotherapy*, 2023, 25: 375-386.
- [9] Quiroz HJ, Valencia SF, Shao H, *et al.* E-selectin-overexpressing mesenchymal stem cell therapy confers improved reperfusion, repair, and regeneration in a murine critical limb ischemia model[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 8: 826687. doi: 10.3389/fcvm.2021.826687.
- [10] Heo JS, Kim S. Human adipose mesenchymal stem cells modulate inflammation and angiogenesis through exosomes [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 2776. doi: 10.1038/s41598-022-06824-1.
- [11] 王晓旭,李超然,王惠,等. 脐带来源间充质干细胞抑制巨噬细胞 M1 极化[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40: 673-679.
- [12] Court AC, Le-Gatt A, Luz-Crawford P, *et al.* Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21: e48052. doi: 10.15252/embr.201948052.
- [13] Lu D, Chen B, Liang Z, *et al.* Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 92: 26-36.
- [14] Mohamed SA, Howard L, McInerney V, *et al.* Autologous bone marrow mesenchymal stromal cell therapy for “no-option” critical limb ischemia is limited by karyotype abnormalities[J]. *Cytotherapy*, 2020, 22: 313-321.
- [15] Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, *et al.* A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 143. doi: 10.1186/1479-5876-11-143.
- [16] Gupta PK, Shivashankar P, Rajkumar M, *et al.* Label extension, single-arm, phase III study shows efficacy and safety of stempeucel in patients with critical limb ischemia due to atherosclerotic peripheral arterial disease[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14: 60. doi: 10.1186/s13287-023-03292-w.
- [17] Fujita Y, Kawamoto A. Stem cell-based peripheral vascular regeneration [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 120: 25-40.
- [18] Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, *et al.* Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16: 245-257.
- [19] Soria-Juan B, Garcia-Arranz M, Llanos Jiménez L, *et al.* Efficacy and safety of intramuscular administration of allogeneic adipose tissue derived and expanded mesenchymal stromal cells in diabetic patients with critical limb ischemia with no possibility of revascularization: study protocol for a randomized controlled double-blind phase II clinical trial (The NOMA Trial). *Trials*, 2021, 22: 595. doi: 10.1186/s13063-021-05430-2.
- [20] Ashoobi MT, Hemmati H, Aghayan HR, *et al.* Wharton's jelly mesenchymal stem cells transplantation for critical limb ischemia in patients with type 2 diabetes mellitus: a preliminary report of phase I clinical trial[J]. *Cell Tissue Res*, 2024, 395: 211-220.
- [21] Shirbaghaee Z, Heidari Keshel S, Rasouli M, *et al.* Report of a phase 1 clinical trial for safety assessment of human placental mesenchymal stem cells therapy in patients with critical limb ischemia (CLI) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14: 174. doi: 10.1186/s13287-023-03390-9.
- [22] Kwiatkowski T, Zbierska-Rubinkiewicz K, Krzywon JW, *et al.* Combined intra-arterial and intra-muscular transfer of Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells in no-option critical limb ischemia-CIRCULATE N-O CLI pilot study[J]. *Postep Kardiol Inter*, 2022, 18: 439-445.
- [23] Zahavi-Goldstein E, Blumenfeld M, Fuchs-Telem D, *et al.* Placenta-derived PLX-PAD mesenchymal-like stromal cells are efficacious in rescuing blood flow in hind limb ischemia mouse model by a dose- and site-dependent mechanism of action[J]. *Cytotherapy*, 2017, 19: 1438-1446.
- [24] Norgren L, Weiss N, Nikol S, *et al.* PACE: randomized, controlled, multicentre, multinational, phase III study of PLX-PAD for critical limb ischaemia in patients unsuitable for revascularization: randomized clinical trial [J]. *Br J Surg*, 2024, 111: znad437. doi: 10.1093/bjs/znad437.
- [25] Arango-Rodríguez ML, Mateus LC, Sossa CL, *et al.* A novel therapeutic management for diabetes patients with chronic limb-threatening ischemia: comparison of autologous bone marrow mononuclear cells versus allogeneic Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14: 221. doi: 10.1186/s13287-023-03427-z.